

腹水腫瘍細胞の解糖能阻害がグリコーゲン合成, DNA合成に及ぼす影響

著者	佐藤 正弘
号	260
発行年	1964
URL	http://hdl.handle.net/10097/17954

氏 名 さ と う ま さ ひ ろ
佐 藤 正 弘

授 与 学 位 医 学 博 士

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 3 9 年 3 月 2 5 日

学 位 授 与 の 根 拠 法 規 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項

研 究 科 ・ 専 攻 の 名 称 東 北 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科
内 科 学 系

学 位 論 文 題 目 The influence of the inhibition of
glycolysis on glycogenesis and DNA
synthesis in ascites tumor cells
(腹 水 腫 瘍 細 胞 の 解 糖 能 阻 害 が グ リ コ ー ゲ ン 合 成 ,
D N A 合 成 に 及 ぼ す 影 響)

指 導 教 官 東 北 大 学 教 授 岡 捨 己

論 文 審 査 委 員 東 北 大 学 教 授 菊 地 吾 郎

東 北 大 学 教 授 諏 訪 紀 夫

論文内容要旨

研究目的

従来腫瘍の生化学的研究において、肝癌では正常肝に比してグリコーゲン含量が著るしく少ないことが認められている。この理由として癌細胞ではその代謝特異性のために細胞内に入つたグルコースが Embden-Meyerhof 経路または Warburg-Dickens 短絡に入り、グリコーゲン合成系に入らないためと考えられている。しかし吉田等の見出した一連の腹水肝癌の中には悪性度が高いにもかかわらず、グリコーゲン含量が多い系列も認められている。この際このグリコーゲンよりの解糖が癌細胞の DNA 合成のエネルギー源に利用されていると推測される。従つて解糖を抑制すれば DNA 合成能も抑制されると考えられる。著者は Embden-Meyerhof 経路におけるグリセリンアルデヒド-3-リン酸エステル脱水素酵素を阻害するモノヨード醋酸(IA)を用いて癌細胞の解糖を抑制して、グリコーゲン合成能及び DNA 合成能がどのような影響を受けるかを追求した。

実験方法及び結果

腹水肝癌 AH 66 F 細胞及び吉田肉腫細胞を雄系雄ラット腹腔内移植後 3~5 日目の腹水腫瘍細胞を使用した。更に吉田肉腫細胞では牛血清と Krebs-Ringer bicarbonate の当量混合液で 24 時間培養した細胞を用いた。〔1〕AH 66 F のグリコーゲン合成過程の検討 (a) ^3H -グルコースを用いたオートラジオグラフを観察した。Krebs-Ringer Tris 緩衝液 3 ml に細胞 2×10^7 を浮遊せしめ、グルコース 10mg と ^3H -グルコース $5\mu\text{C}$ を加え、95% N_2 と 5% CO_2 の気相下で 3 時間反応させた。細胞をスライドガラス上に塗抹、PAS 染色ののち、ストリッピング法によるオートラジオグラフィを行つた。顕鏡すると還元銀粒子は PAS 陽性物質と一致して出現し、その他の細胞質及び核に相当する部位には少量の銀粒子を認めたに過ぎなかつた。このことは細胞内にとり入れられた ^3H -グルコースの大部分がグリコーゲンに合成されたことを示すと考えられる。(b) 10^7 の細胞を前記と同じ反応条件で反応開始した。経時的に細胞をとり出し、細胞内グリコーゲンを Bell 等の熱水抽出法により抽出し、グリコーゲン量を Anthrone 法により測定し、更にグリコーゲン抽出に至るまでの各分画の放射能を窓なしガスフローカウンタで測定した。これによると細胞内グリコーゲン量は反応後減少し、30 分を極小値として再び増大した。これに対しグリコーゲン分画への ^3H の転入は直線的に増大した。また ^3H の転入はグリコーゲン分画に最も多く、TCA 不溶分画、アルコール可溶分画、残渣等には極めて少なく、従つてグルコース→グリコーゲン合成経路の発達が推察された。〔2〕解糖阻害剤のグリコーゲン合成過程に及ぼす影響 (a) AH 66 F 及び吉田肉腫細胞の嫌気性解糖能を Warburg 検圧装置を用いて測定した。Krebs-Ringer bicarbonate 3 ml (グルコース 10mg を含む) に細胞

10^7 ヶを浮遊せしめ、IAを加え反応させた。IA 10^{-4} Mで解糖活性の著るしい抑制を示した。しかし反応液をKrebs-Ringer Tris 緩衝液とし、気相を純酸素として測定した呼吸能はIAのこの濃度では影響を受けなかつた。(b) ^3H -グルコースのグリコーゲン分画へのとり込みはIA投与で対照に比し各時間とも少なく、反応60分では対照の1/3であつた。しかし他の分画へのとり込みには差が認められなかつた。グリコーゲン量はIA投与で各時間ともやや増大していた。従つて相対比放射能($\text{cpm}/\mu\text{g}$ グルコース当量)を見ると反応60分で対照11.8に対しIA 10^{-4} Mでは3.5と低値であつた。これはグリコーゲン代謝回転の遅延を意味するものと考えられる。〔3〕 解糖阻害剤のDNA合成能に及ぼす影響(a) AH66F及び吉田肉腫細胞に ^3H -チミジンをういたオートラジオグラフを観察した。反応条件はAH66Fでは ^3H -グルコースを用いた場合と同様であり、吉田肉腫では反応液に牛血清とKrebs-Ringer bicarbonateの当量混合液を用いた点のみが異なる。これにIAを加えて反応せしめた。オートラジオグラフィ操作のうち、標本を顕鏡すると、無処置対照では銀粒子は細胞核に一致して観察され、細胞質に認められることはなかつた。IA処置では核に一致した銀粒子は少量認められたにすぎず、DNA合成阻害がうかがわれた。(b) 吉田肉腫細胞のDNA合成能及びDNAへの ^3H -チミジンのとり込みに及ぼすIAの影響を観察した。反応液として前記の混合液40mlに細胞 10^7 ヶを浮遊せしめ、IAを加えて24時間反応せしめた。細胞のDNA-P量をSchmitt-Thannhauserの方法により求め、また ^3H のDNAへのとり込みをガスフローカウンターにより求めた。結果は無処置対照では24時間で細胞数が約2倍に増大したが、IA投与ではその増大が認められず、そのDNA-P量も少なかつた。 ^3H のDNAへのとり込みはIA投与で著るしく抑制された。従つて比放射能($\text{cpm}/\mu\text{g}$ DNA-P)は対照で548.9%に対しIA 5×10^{-5} Mでは27.3と極めて低値であり、DNA合成阻害が推察された。

結 論

(1) AH66F細胞に ^3H -グルコースを用いたオートラジオグラフで、PAS陽性物質にのみ一致してラベルされていることから、グルコース→グリコーゲン合成系の発達が細胞化学的に認められた。またこの結果は生化学的にも確かめられた。(2) 適当な濃度のIAを用いるとAH66F細胞の解糖活性が抑制され、細胞内グリコーゲンの代謝回転の遅延が観察された。(3) ^3H -チミジンをういたオートラジオグラフで、IA処置では対照に比して核に一致したラベルが少ないことから、癌細胞の解糖能阻害とDNA合成能阻害との間に平行関係があることが認められた。またこの結果は生化学的にも確かめられた。

審 査 結 果 の 要 旨

著者は癌細胞の旺盛な解糖を抑制した場合、その細胞内グリコーゲン合成及びDNAなどのように影響されるかを検討している。すなわち腹水肝癌AH66F及び吉田肉腫を用い、解糖抑制にはEmbden-Myerhof経路におけるグリセリンアルデヒド-3-リン酸エステル脱水素酵素を阻害するモノヨード醋酸(IA)を用いた。実験方法として ^3H を用いたオートラジオグラフィによる組織化学的観察を中心に、併せて生化学的方法を行い、次のような知見を得ている。

(1) AH66Fのグリコーゲン合成過程を知るために、嫌気性条件下で細胞をグルコースと ^3H -グルコースと共に反応せしめ、オートラジオグラフを観察した。細胞内に入つた ^3H はPAS陽性物質に一致してラベルされるが、その他の細胞質部位及び核はラベルされることが少ない。この際、細胞各分画への ^3H の転入を測定すると、グリコーゲン分画に最も多く、TCA不溶分画、アルコール可溶分画、残渣等には極めて少なかつた。以上の結果から、細胞内に取り入れられた ^3H -グルコースの大部分がグリコーゲンに合成され、従つてグルコース→グリコーゲンの合成系路の発達を推察している。

(2) 次にIAを用い解糖活性を抑制すると、 ^3H -グルコースのグリコーゲン分画へのとり込みは少なくなり、その他の分画へのとり込みには影響を及ぼさない結果を得ている。他方グリコーゲン量はIA投与で逆に増加した。従つて相対比放射能($\text{cpm}/\mu\text{g}$ グルコース当量)はIA投与では対照に比し著るしく少なかつた。これはグリコーゲンの代謝回転の遅延を意味していると考えている。

(3) 更にIAを用いて解糖を抑制した際のDNA合成能に及ぼす影響を観察するためにAH66F及び吉田肉腫細胞を ^3H -チミジンと共に嫌気性条件下で反応せしめた後、オートラジオグラフを観察した。無処置対照例では細胞核に強くラベルされ、細胞質には殆んどラベルされず、著るしいDNA合成が観察されたのに対し、IA処置では細胞核に極く少量ラベルされたのみでDNA合成阻害が窺知された。また反応後の吉田肉腫細胞のDNA量をSchmitt-Thauhauserの方法により求め、更にDNAへの ^3H のとり込みを測定すると無処置対照に比しIA投与ではDNAへの ^3H のとり込みが極めて少なかつた。比放射能($\text{cpm}/\mu\text{g}$ DNA-P)は対照の約 $1/20$ で強いDNA合成阻害が観察された。

以上の如く著者は癌細胞の代謝特異性の一つである旺盛な解糖を抑制した場合、癌細胞の代謝態度をグリコーゲン合成及びDNA合成という面で形態学的、生化学的に観察し、上記の知見を得たがこの結果は癌化学療法の基礎的研究として寄与するところ大であると考えられる。

したがって本論文は学位を授与するに値するものと認める。